



**FACULTAD DE FARMACIA**  
**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**  
**TÍTULO: DISEÑO Y SÍNTESIS DE**  
**FÁRMACOS INHIBIDORES DE LA COX**  
**PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

Autor: María Cabañero García  
Tutor: Juan Francisco González Matilla  
Convocatoria: Junio

## **ÍNDICE:**

* INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	
1.1. Epidemiología y etiología.....	Pág. 3
1.2. Sintomatología.....	Pág. 4
1.3. Neuropatología.....	Pág. 4
1.4. Tratamiento.....	Pág 8.
-Fármacos que actúan sobre la pérdida colinérgica.....	Pág 8.
-Antagonistas del receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA)..	Pág 9
-Fármacos quelantes.....	Pág. 9
-Antioxidantes.....	Pág. 10
-Fármacos que actúan sobre A $\beta$ .....	Pág. 10
-Tratamiento antiinflamatorio.....	Pág. 11
-Tratamiento anti Tau.....	Pág. 12
1.5. COX.....	Pág. 12
1.5.1. Fisiología.....	Pág. 12
1.5.2. Isoformas.....	Pág. 12
* OBJETIVOS .....	Pág. 14
* METODOLOGÍA.....	Pág. 14
* RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	Pág. 14
-Papel de diversos fármacos sobre la neuroinflamación .....	Pág. 14
-Estudio del sistema del complemento.....	Pág. 15
-Papel de las citoquinas inflamatorias.....	Pág. 16
- Diseño de nuevos fármacos.....	Pág. 17
- Ejemplo de una síntesis de un inhibidor de la COX.....	Pág. 18
* CONCLUSIÓN.....	Pág 19
* BIBLIOGRAFÍA .....	Pág. 20

## **RESUMEN**

Actualmente, se ha descubierto que uno de los procesos relacionados con la enfermedad del Alzheimer es la neuroinflamación; y por tanto puede ser una de las muchas dianas desde las que podemos abordar el tratamiento. En este proceso se generan citoquinas inflamatorias, los componentes del complemento y los radicales libres, entre otras sustancias. Se trata de especies tóxicas para el sistema nervioso, por lo que son atacadas por la microglía produciéndose destrucción neuronal. Uno de los descubrimientos actuales en lo que respecta al proceso inflamatorio es que el agregado  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ) es un potente activador del complemento en humanos y por tanto, produce inflamación neuronal; aunque no ocurre lo mismo en ratones. También se ha visto que el sulfuro de hidrógeno, una molécula endógena, puede tener un efecto beneficioso en la enfermedad.

En cuanto al avance terapéutico se están investigando nuevos fármacos, donde destacamos el GIBH-130, un fármaco capaz de actuar en la microglía que disminuye la inflamación y proporciona una mejoría notable de la memoria. Y comparándolo con otros fármacos utilizados, como es el caso de la memantina, ha supuesto una disminución de efectos adversos y deterioro cognitivo. Y en la investigación puede ayudar al desarrollo de otros fármacos eficaces en trastornos del SNC.

## **INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES:**

### **1.1 Epidemiología y etiología**

El Alzheimer se trata de una enfermedad neurodegenerativa donde se ve una pérdida progresiva de la memoria y disfunción cognitiva; se asocia a una pérdida paulatina de las neuronas colinérgicas. Su etiología se desconoce y existen dos tipos según su origen: la familiar y la esporádica. La esporádica es más prevalente y se da a una edad más avanzada.

Esta enfermedad se engloba en un conjunto de patologías conocidas como *demencia*; que tras el cáncer y las enfermedades cardiovasculares supone un gran coste económico al Estado (*según la Fundación Española de Enfermedades Neurológicas*) ya que afecta a más de 47 millones de personas en todo el mundo.

En España están afectadas entre 500.000 y 800.000 personas (*según un informe detallado de PWC*). Esta enfermedad empieza a hacerse visible a edades de entre 50 y 60 años y puede durar entre 8 y 15 años. El número de enfermos de Alzheimer aumentará en el futuro.

Los factores de riesgo relacionados con la aparición de esta enfermedad son la depresión; diabetes; infecciones; el sexo (afectando a casi el doble de mujeres que de hombres); y el nivel cognitivo ya que se ve que afecta más a personas con un nivel de estudios menor. Además, se ha visto que hay un factor genético.

El 21 de septiembre se celebra el día mundial del Alzheimer <sup>[6]</sup>.

### **1.2 Síntomatología:**

Los enfermos presentan dificultad para escribir, hablar, desorientación espacial y dificultad para resolver problemas. Comienza afectando a hechos recientes pero con el progreso de la enfermedad deja de recordar hechos más antiguos (amnesia anterógrada). Esta sintomatología sería la más típica de la enfermedad. También va a aparecer con el tiempo trastornos en el ciclo del sueño, agresividad, ansiedad, delirio, pérdida de peso y disfagia.

Esta enfermedad empieza con trastornos de la memoria y va a interferir en las actividades diarias.

La muerte llega por complicaciones secundarias y al debilitamiento que conlleva la enfermedad. En las últimas fases, el paciente no suele conocer a nadie, y normalmente se encuentra encamado <sup>[5]</sup>.

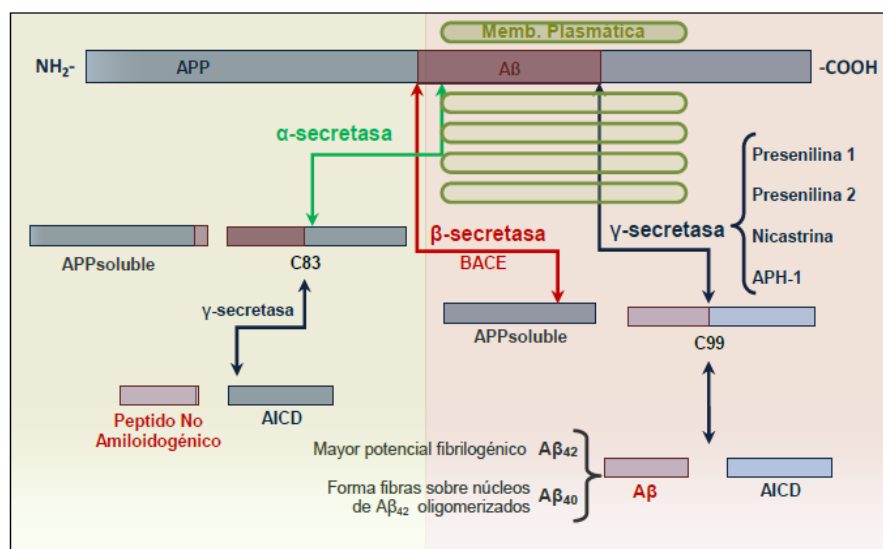
### **1.3. Neuropatología:**

Para abordar un tratamiento para esta enfermedad es necesario conocer su neuropatología, y dado la complejidad de la patología, se trata de una enfermedad multidiana.

En la enfermedad del Alzheimer se dan una serie de anomalías en las regiones cerebrales, la más característica afecta a la corteza, en concreto a las neuronas piramidales glutamatérgicas. Otras zonas que normalmente también están afectadas

son: hipocampo, neocortex, área entorrinal, tálamo anterior, núcleos amigdalinos, núcleo basal de Meyner, y núcleos monoaminérgicos del tronco encefálico.

Un cambio que se produce en el cerebro de estos pacientes es la acumulación de los **péptidos  $\beta$ -amiloide** ( $A\beta$ ). Para comprenderlo hay que estudiar el procesamiento de la APP. La proteína precursora  $\beta$ -amiloide (APP) tiene varias isoformas con alrededor de 700 aa. Se trata de una proteína transmembrana tipo I que consta de un dominio N-terminal extracelular y un dominio C terminal intracelular más corto. El fragmento  $\beta$  amiloide ( $A\beta$ ) se encuentra entre la región extracelular y la transmembrana, que se obtienen tras el procesamiento por las secretasas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . El proceso se resume en la figura 1.



**Figura 1:** Esquema de producción de  $A\beta$ .

En primer lugar actúa la  $\alpha$  secretasa, corta al APP entre la posición 16 y 17 dando lugar a un fragmento soluble de 83 aa cuya vida es de unas 4 horas. Después la  $\beta$  secretasa, tras haber sido internalizado en un endosoma, quita el extremo N-libre de la secuencia  $A\beta$ . Y  $\gamma$  secretasa liberará el péptido  $\beta$  amiloide del fragmento C terminal intracelular llamado AICD. Este fragmento puede regular el funcionamiento de algunos genes, también puede estar relacionado con la señalización con  $Ca^{2+}$  o con la memoria espacial.

$A\beta$  tiene una estructura en lámina  $\beta$  birrefringente y consta de unos 40 a 42 aa. Comenzará agregándose  $A\beta_{42}$  y dará lugar a protofibrillas y oligómero donde se depositará  $A\beta_{40}$  más fácilmente.

La actividad de  $\beta$  secretasa depende de una única proteína, y la de  $\gamma$  secretasa depende de 4 proteínas, en concreto de nicastrina, APH 1, preselina 1 (PEN1) y preselina 2 (PEN2). Una alteración en cualquiera de estos genes podría dar lugar a la enfermedad.

Se conocen más de 220 mutaciones familiares de la EA donde 180 van a estar relacionadas con la mutación en PEN1, 20 con PEN2 y más de 30 con APP. Hoy sabemos que las mutaciones en la proteína precursora del  $A\beta$  son poco frecuentes. Las alteraciones que con mayor probabilidad se dan se localizan en las zonas donde actúan las  $\beta$  y  $\gamma$  secretas y son a causa de: una mayor producción de  $A\beta_{42}$  frente a  $A\beta_{43}$ , agregación, mutación en las preselinas promoviendo un funcionamiento mayor de las  $\beta$  secretasas, potencial neurotóxico mayor y corte mayor por la  $\beta$  y  $\gamma$  secretasa.

El péptido  $A\beta$  puede interaccionar con varios receptores celulares; en el sistema inmunitario va a provocar su propia fagocitosis pero este hecho va a ser insuficiente para solucionar la patología. Otra acción que provoca es que aumento de GSK3 al interaccionar con la vía de señalización de la insulina y Wnt. Como consecuencia de este aumento de concentración, se inhibe al  $PI_3K$  (intermediario de otra ruta de señalización). Debido a esa disminución de  $PI_3K$  se fosforilan diversas moléculas, entre ellas destaca la proteína Tau y el APP; y se generan los ovillos neurofibrilares y el péptido  $A\beta$ , lesiones presentes en los cerebros de los enfermos.

Los **ovillos neurofibrilares** se localizan en el interior de la neurona, en concreto en los cuerpos neuronales y dendritas apicales. Tienen unos filamentos compuestos por una proteína llamada Tau que está hiperfosforilada cuya función es modular la adhesión de los microtúbulos y su estabilización. En la parálisis supranuclear o la enfermedad del Parkinson podemos encontrar esta proteína Tau también.

Las **placas seniles** (amiloideas o neuríticas) se localiza principalmente en el hipocampo y la amígdala. Se trata unos depósitos de péptidos amiloides en los espacios interneuronales. Pueden aparecer en regiones corticales y subcorticales.

No conocemos bien el mecanismo neurotóxico, pero se piensa que  $A\beta_{42}$  induce oxidación proteica y peroxidación lipídica generando un **aumento de radicales libres y agua oxigenada**. De acuerdo a esto, se ha propuesto utilizar fármacos antioxidantes.

En el progreso de la enfermedad se da una **pérdida significativa de los niveles de algunos neurotransmisores**, acetilcolina y colina, que puede estar asociado a estas lesiones en la corteza cerebral, en zonas donde están implicados procesos de aprendizaje y memoria, y de otros neurotransmisores como dopamina y serotonina. Esto conlleva a una atrofia neuronal y disminución de la sinápsis.

Esta enfermedad también tiene un **componente inflamatorio**. La neuroinflamación es una característica de la enfermedad del Alzheimer y probablemente afecte a su progreso. Destaca el papel de la microglía, el sistema del complemento y las citoquinas proinflamatorias.

La respuesta inmune denominada *gliosis* implica a la microglía y los astrocitos, es inespecífica. Hay varios tipos de microglía: microglía distrófica, microglía en reposo y microglía activada; esta última se encuentra rodeando a las placas seniles.

Se piensa que se va a inducir una respuesta primaria por la microglía destructiva ante la aparición de A $\beta$  que irá acompañada de la secreción de mediadores de inflamación (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ...) que van a inducir la apoptosis neuronal o bien amplifican la inflamación local.

En el cerebro de enfermos de Alzheimer se ha detectado la producción de mediadores de citoquinas.

La inflamación también tiene efectos constructivos, donde se procesa una respuesta quimiotáctica y fagocítica hacia los agregados de A $\beta$ . Esta acción es mediada por la microglía activada.

Por último, junto la microglía distrófica se encuentra la proteína Tau y está sufriendo la *citorrexis*, un proceso degenerativo; también se asocia una disminución de la neuroprotección.

Se cree que cuando se ha producido el daño neuronal se libera el neuropilo, ATP, neurotransmisores, factores de crecimiento y citoquinas que activan la microglía. Si el daño es pequeño se liberarán citoquinas y factores de crecimiento. Mientras que si el daño es grande hay dos fenotipos neurotóxicos: puede darse M1 donde se libera grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias y óxido nítrico (NO); o bien M2 donde la liberación de NO no es muy elevada.

El NO puede ser sintetizado en la NO sintetasa (NOS) en la microglía y NOS inducible, NOS endotelial y NOS neuronal. Este NO actúa como señalizador intracelular, y en un paciente con demencia actúa con un papel neurotóxico, aunque también se le ha descrito como neuroprotector. En corteza, hipocampo y cerebelo de los enfermos de Alzheimer se ha visto un incremento de nNOS. La producción de NO puede generar un radical peroxinitrito al reaccionar con el radical superóxido y dar lugar a la inactivación de proteínas por su nitración. El A $\beta$  puede generar estrés oxidativo a través de la generación de NO o activando a LT CD4+, que al liberar citoquinas activarán la microglía y como consecuencia aumentarán los niveles de iNOS <sup>[5]</sup>.

Un ambiente inflamatorio se cree que puede promover la hiperfosforilación de la proteína Tau conllevando a la formación de los ovillos neurofibrilares <sup>[5]</sup> <sup>[3]</sup>.

Los estudios han demostrado que la progresión del daño va a ser causa de las señales inflamatorias. Se ha visto que dos o más episodios infecciosos en personas envejecidas en un periodo de 4 años incrementa el riesgo de padecer Alzheimer dos veces, y además la presencia elevada de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  se ha asociado a un mayor deterioro cognitivo <sup>[5]</sup>.

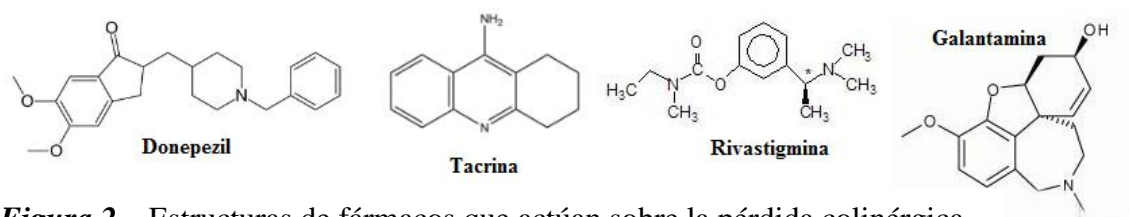
### **1.5. Tratamiento:**

No existe un tratamiento que sirva como prevención a la degeneración neuronal, si no que es paliativo y se va a tratar de mejorar la memoria y función cognitiva incidiendo en diferentes dianas terapéuticas. Se ha dado un aumento de la demanda de estos fármacos debido al aumento de la prevalencia de esta enfermedad. Actualmente, se están estudiando diversas dianas terapéuticas con el fin de prevenir la enfermedad <sup>[4]</sup>.

- **Fármacos que actúan sobre la pérdida colinérgica**

El fin va a ser estabilizar el deterioro cognitivo utilizando fármacos inhibidores de acetilcolinesterasa, enzima que hidroliza el neurotransmisor acetilcolina (*donepezil*, *tacrina*, *rivastigmina* y *galantamina*; figura 2). Desde los primeros estudios se ha observado una pérdida significativa de las neuronas colinérgicas en el núcleo basal <sup>[5]</sup> <sup>[2]</sup>.



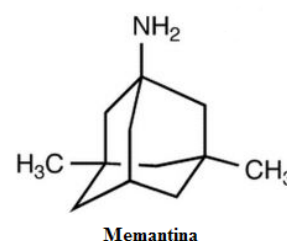


**Figura 2.** Estructuras de fármacos que actúan sobre la pérdida colinérgica.

- **Antagonistas del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA).**

El NMDA se trata de uno de los receptores del glutamato, neurotransmisor excitador en las neuronas corticales y del hipocampo. Este receptor va a estar participando en los procesos de aprendizaje y memoria.

La isquemia puede conducir a una estimulación excesiva de NMDA, y dar lugar a citotoxicidad. Por ello, estos fármacos al bloquear esta estimulación puede proteger contra el daño adicional. Entre estos fármacos destacamos la **memantina** (figura 3), que parece tener menos efectos adversos que los colinérgicos, destacando los mareos como efecto secundario más frecuente. También se ha visto empeoramiento de las alucinaciones y confusión <sup>[5] [2]</sup>.

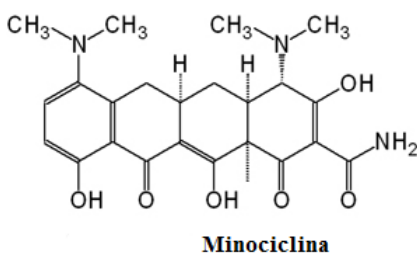


**Figura 3.** Antagonista NMDA.

- **Fármacos quelantes:**

Un actual estudio sugiere que dentro de las placas seniles hay un exceso de zinc, hierro, cobre y/o aluminio, y aumenta el daño oxidativo provocado por A $\beta$ . Por lo que una de las terapias puede estar dirigida a la quelación de estos metales, y así se interrumpiría la interacciones entre A $\beta$  <sup>[7]</sup>.

Se descubrió que una tetraciclina **minociclina** (figura 4) podría ralentizar la progresión de la enfermedad del Alzheimer. Este fármaco tiene varios mecanismos de acción, entre ellas se destaca que es quelante de los iones de Zn. Las metaloproteasas de la matriz de



la membrana (MMP) son dependientes de zinc y va a ser responsable del cambio de la matriz extracelular y de la degradación de proteínas. Cuando se ve afectada, se altera la permeabilidad de BHE, y posteriormente se produce la degradación de la

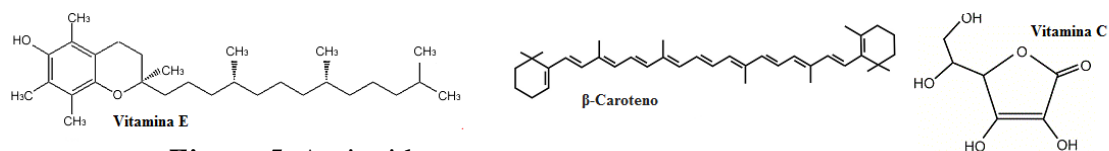
**Figura 4.** Fármaco quelante.

mielina. Bloqueando a este nivel se produce un cambio conformacional de la enzima y por tanto la pérdida de su funcionalidad <sup>[4]</sup>.

- **Antioxidantes:**

En el estudio de la patología se ha llegado a la conclusión que el péptido beta A<sub>42</sub> produce radicales libres, generando por ello la teoría de que el estrés oxidativo puede desarrollar esta enfermedad.

Se ha visto que en el cerebro de los pacientes había niveles elevados de antioxidantes endógenos, y que en estudios in- vitro se ha reducido la toxicidad de las placas A $\beta$  con el uso de antioxidantes como vitamina E, beta-caroteno, flavonoides, vitamina C (figura 5) <sup>[2] [5]</sup>.



**Figura 5.** Antioxidantes.

Dos estudios prospectivos de cohortes llegó a la conclusión de que una dieta con mayor ingesta de antioxidantes se asocio a un menor riesgo de enfermedad <sup>[2]</sup>.

En los estudios hechos hay problemas que limitan la confianza de que la **vitamina E** sea eficaz para el tratamiento del Alzheimer, pero en definitiva en una terapia combinada puede ser compensado con la memoria y puede ser eficaz para la enfermedad del Alzheimer moderada. Aunque no se recomienda su consumo la prevención de alguna demencia <sup>[2]</sup>.

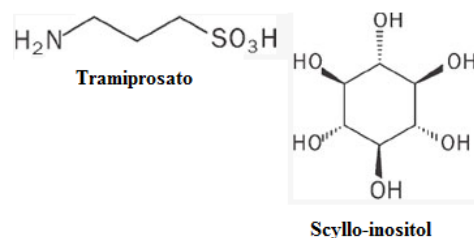
- **Fármacos que actúan sobre A $\beta$  :**

Se puede abordar desde diferentes puntos, como es la *inhibición de la agregación* de A $\beta$ , *aumentando la degradación* de A $\beta$ , o *actuando sobre la* modulación de la producción de A $\beta$ <sub>42</sub> <sup>[5]</sup>.

Se puede *potenciar la degradación* de este al incidir sobre los inhibidores de las enzimas que lo degradan (nepsilisina, IDE y plasmina), un ejemplo es la PAI-1 o transportando A $\beta$  fuera del SNC. Para ello, se actúa sobre el RAGE que va a potenciar

el paso a SNC del A $\beta$  y sobre LRP-1 que lo que hace es mediar el paso de A $\beta$  a la circulación periférica [5].

Otra opción es *inhibir la agregación* de A $\beta$  (figura 6). Los fármacos descubiertos están en investigación, el **tramiprosato u homotaurina** que se encuentra en ensayos clínicos de fase III, y no se ha demostrado diferencias significativas entre los grupos del estudio [5]. Otro fármaco



**Figura 6.** Inhibidores de la agregación de A $\beta$ .

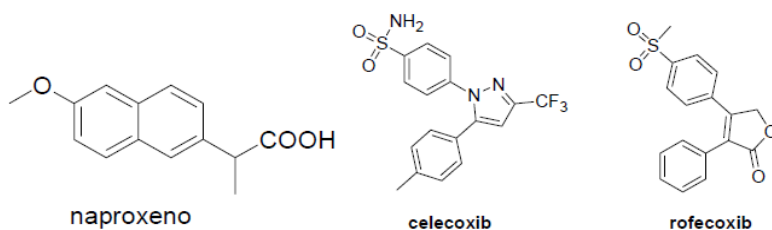
que destaca es el scyllo-inositol, un derivado del **ciclohexanohehexol** (estructura en figura 6), que se encuentra en ensayos de Fase II. Estabilizaría la forma no tóxica de A $\beta$  al competir con el fosfatidilinositol endógeno responsable de la agregación de A $\beta$  [7].

El fragmento A $\beta_{42b}$  se forma por la escisión de las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$  secretasa e induce oxidación proteica y peroxidación lipídica generando radicales libres y agua oxigenada. Actualmente el laboratorio Lilly trabaja con un inhibidor de  $\gamma$  secretasa [2] [5].

También se ha visto la inmunoterapia como terapia para el Alzheimer, en la que actualmente hay 3 ensayos clínicos en fase III: **bapineuzumap** (Elan pharmaceuticals) diseñado para *disminuir la formación* de placa y *promover la destrucción* de A $\beta$ , **solanezumap** (Lilly) e **inmunoglobulina G intravenosa** (Baxter) [2] [5].

- **Tratamiento antiinflamatorio:**

Se ha visto que personas en tratamiento a largo plazo con AINEs tienen reducido el riesgo de padecer Alzheimer, por eso se ha planteado actuar ante esta diana terapéutica. Hay estudios en los que se utilizan celecoxib o rofecoxib (figura 7), que inhiben la COX 2; o naproxeno (figura 8), que inhibe la COX 1 y 2. Y como se ha indicado antes, la microglía activada va a liberar mediadores inflamatorios e interviniendo a este nivel se podría ralentizar el progreso de esta enfermedad [1] [5].



**Figura 7.**

- **Tratamiento anti- Tau:**

Como se ha descrito esta proteína está implicada en la adhesión de los microtúbulos y su estabilización, que al actuar sobre ella se evita la formación de los ovillos neurofibrilares. La principal ventaja que presenta estos fármacos es que los fármacos inhibidores de kinasas son utilizados para el tratamiento del cáncer y se conocen sus consecuencias a corto plazo. Pero no se sabe que kinasa específica es la responsable de la fosforilación. Se destaca el azul de metileno como fármaco con esa función que se encuentra en ensayos de fase II <sup>[5]</sup>.

## **1.5. COX:**

### **1.5.1 Fisiología:**

La ciclooxigenasa (COX) se localiza en la membrana y presenta actividad bifuncional, es decir, va a tener dos centros activos uno con función ciclooxigenasa y el otro con actividad peroxidasa.

El ácido araquidónico que se sitúa en la membrana será oxidado por la COX a PGG<sub>2</sub> debido a su actividad ciclooxigenasa. Posteriormente, por su función peroxidasa va a reducir el PGG<sub>2</sub> a hidroxí endoperoxido (PGH<sub>2</sub>). La molécula resultante es altamente inestable y será el intermediario de las diferentes prostaglandinas (PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>), prostaciclina (PGE<sub>2</sub>) y tromboxano (TXA<sub>2</sub>).

Dependiendo de la célula, y epitelio donde actúen la ciclooxigenasa se forman un tipo de prostaglandinas y en diferente cantidad. La PGI<sub>2</sub> se forma por la acción de la enzima prostaciclín sintasa que actúa en las células del endotelio vascular, este tipo de células por acción de la tromboxano sintetasa se va a formar TXA<sub>2</sub> que será liberado por las plaquetas y macrófagos. PGD<sub>2</sub> va a ser sintetizada por la PGD isómera en el cerebro y mastocitos. PGF<sub>2α</sub> va a ser sintetizada por una reductasa en el útero. La PGE isomerasa se localiza en diversos tejidos, tales como riñón, bazo, corazón y por ello se forma la PGE<sub>2</sub> <sup>[1]</sup>

### **1.5.2. Isoformas :** COX-1, COX-2. COX-3 y pCOX-1a y b.

La COX-1 y COX-2 son enzimas que se expresan y regulan por genes distintos, por lo que se encuentran expresadas en cromosomas diferentes. La COX-2 es inducible, su

expresión en los tejidos es muy baja, mientras que COX-1 va a ser constitutiva y mantiene unos niveles de concentración y expresión constantes. Va a tener diversas funciones. Dependiendo del tejido nos encontramos una enzima u otra y se obtendrá una prostaglandina distinta.

En el riñón se va a sintetizar la  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}$  y  $\text{TXA}_2$  por acción de la COX-1 que se van a encargar respectivamente de regular la excreción de sodio y agua, el flujo sanguíneo y modular una correcta filtración glomerular. Y la COX-2 va a estar implicada en la liberación de renina y regulación de excreción de sodio. En el intestino  $\text{PGE}_2$  y  $\text{PGI}_2$  actúan como citoprotectores.

En el aparato cardiovascular se va a expresar tanto la COX-1 como la COX-2. La isoforma COX-1 va a ser la responsable de la producción de  $\text{TXA}_2$  en las plaquetas cuya función es inducir la agregación plaquetaria. La  $\text{PGI}_2$  tiene como función la vasodilatación y es sintetizada principalmente por la COX-2 aunque también participa la COX-1.

Por último la COX-2 se va a expresar en el aparato reproductor femenino, e interviene en la ovulación, en la ruptura del folículo y en la implantación del embrión en el endometrio uterino.

La COX-2 está implicada tanto en procesos fisiológicos como patológicos, como son la inflamación, el dolor, la fiebre y también tiene sobreexpresión en otros pacientes con enfermedades articulares, cáncer y Alzheimer.

En la enfermedad de Alzheimer se ha visto que la COX 2 está sobreexpresada en la zona del corte frontal y que en estadios tempranos también aparece de forma abundante en el hipocampo. La producción de  $\beta$  amiloide induce la expresión de esta enzima, y se aumenta susceptiblemente el daño neuronal apoptótico.

Hay muchas moléculas que pueden inducir o suprimir la expresión de la isoenzima COX 2, que destaca en esta patología. Entre ellas destaca LPS, citoquinas proinflamatorias ( $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-2}$ ), factor de necrosis tumoral ( $\text{TNF } \alpha$ ), factores de crecimiento (EGF), algunos oncogenes y algunas hormonas como moléculas que van a inducir la expresión; y por el contrario los glucocorticoides,  $\text{IL-3}$ ,  $\text{IL-10}$  y  $\text{IL-4}$  van a suprimir su expresión.

La COX-1 se va a localizar dentro de la célula en el retículo endoplasmático, y la COX-2 en la membrana nuclear <sup>[1]</sup>.

### **OBJETIVOS:**

Recogida de información sobre la enfermedad del Alzheimer, en concreto: dianas terapéuticas, inhibidores de la COX y nuevos avances en el tratamiento antiinflamatorio de esta enfermedad.

### **METODOLOGÍA:**

Búsqueda bibliográfica en bases de datos de información sobre la utilización del tratamiento antiinflamatorio para la enfermedad del Alzheimer, así como posibles diseños de fármacos que podrían resultar beneficiosos para la tarapia.

Se ha utilizado PubMed, UptoDate, BioMed Central y artículos publicados vía online.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN:**

La neuroinflamación es una característica de la enfermedad del Alzheimer, que va a desempeñar un papel importante en la progresión de la enfermedad. Cuando se produce daño neuronal se sintetizan citoquinas pro-inflamatorias y NO, dependiendo de la gravedad del daño. Y estos mediadores pueden amplificar la inflamación o incluso promover la apoptosis neuronal. Por ello, se ha intentado buscar nuevos fármacos y estudiar la neuroinflamación desde diferentes tipos de vista <sup>[3]</sup>.

- **Papel de diversos fármacos sobre la neuroinflamación**

Se ha detectado que los inhibidores de la bomba de protones (**IBP**) disminuyen la excreción de TNF $\alpha$  y de IL-6 por la microglía activada, y además se detectó una disminución de la toxicidad de la microglía. Al combinar estos fármacos con la terapia antiinflamatoria, en concreto con el ibuprofeno, se vio un efecto sinérgico beneficioso.

Se ha visto que las placas A $\beta$  pueden activar la microglía, para ello se cultivo células del hipocampo y se trataron con dichas placas donde una proliferación de células proinflamatorias que conllevo a muerte neuronal. En un nuevo estudio se utilizó **extracto de arándano rojo**, y se vio que también tenía efecto antiinflamatorio a nivel neuronal. Se observó una inhibición de la proteína quinasa activada P44/42 (MapK) y se inhibió por tanto la activación microglial inducida por la placas  $\beta$  amiloides.

También se comparó la activación de la microglía en ratones y humanos, donde se vio que la expresión de iNOS es muy abundante en ratones, mientras que en humanos no tanto, mientras que se produciría más A $\beta$ . Por ello se sigue investigando para entender la enfermedad <sup>[3]</sup>.

- **Estudio de los astrocitos.**

Recientemente se han hecho estudios en los que se demostró que los **astrocitos** expresan el receptor de IFN  $\gamma$ , y en cultivos activados por IFN  $\gamma$  se demostró que son tóxicos para los neuroblastomas humanos sh-sy5y <sup>[3]</sup>.

- **Estudio del sistema del complemento.**

Otro objeto de estudio en la enfermedad del Alzheimer es el **sistema del complemento**, se vio que puede ser activado levemente en la patología de manera que la cascada al producir anafilotoxinas pueda promover la inflamación. Un importante descubrimiento fue que A $\beta$ , pentaxinas, amiloide P y la proteína reactiva C activa la cascada del complemento, también ocurre con los anticuerpos. Pero se vio un mecanismo distinto en humanos y ratones transgénicos; en el ratón se une mucho más fácilmente a C1q, esto explica que se active más fácilmente el complemento, y que la vacunación con A $\beta$  provoque la eliminación de los depósitos de A $\beta$  <sup>[3]</sup>.

En otro ensayo se cruzó los ratones deficientes en complemento C3 con el precursor de proteína amiloide  $\beta$  (A $\beta$ PP) y se observó una aceleración de la placa A $\beta$  y degeneración neuronal.

El factor H es un inhibidor endógeno de la vía alternativa, que puede alterar el riesgo de desarrollar degeneración macular cuando se da polimorfismo. Cuando este es ineficaz deja a las células epiteliales retinales vulnerables al ataque del MAC

produciéndose una degeneración macular. En AD esta degeneración se produce mediante la activación de la vía clásica <sup>[3]</sup>.

- **Papel de las citoquinas inflamatorias.**

Como se ha desarrollado con anterioridad las citoquinas inflamatorias tienen un papel fundamental en la inflamación de la microglía, y se ve una gran abundancia en los cerebros de los enfermos. Alteraciones en los alelos en los que se expresan estas citoquinas pueden causar un mayor riesgo de AD. Pero algunas evidencias indican que los polimorfismos en los genes no implican un mayor nivel de la citoquina proinflamatoria IL 10. Se desarrolló un estudio en los que se interviniese con el uso de agonistas de PPAR-  $\gamma$ , disminuyendo así la inflamación de la microglía. Se vio resultados positivos.

Un estudio concluyó que el cerebro de enfermos de Alzheimer había una elevación de IL6 y 8 y MCP-1. Se hizo un cultivo de microglía y astroglía que producían muchas citoquinas proinflamatorias y esta era regulada por A $\beta$ .

También se han desarrollado otros estudios donde se vio como MIF (factor inhibitorio de la migración de los macrófagos) promueve la producción de las citoquinas proinflamatorias tales como TNF  $\alpha$ , IL6 e IFN  $\gamma$ . Encontrándose una elevación significativa en líquido de médula espinal. Su acción puede ser bloqueada por etanercept una inmunoglobulina humanizada que se une al TNF $\alpha$ .

Y por último también se ha investigado nuevos mediadores inflamatorios, para ello se hizo un estudio utilizando una técnica de etiquetado isotópico estable por aminoácidos en cultivo celular (SILAC) para examinar las proteínas generadas por células THP-1. Con esta técnica se identifica los cambios en la generación de proteínas. Se hizo dos cultivos, uno se hizo en un medio L-arginina ligero; y el otro fue estimulado con lipopolisacáridos e IFN  $\gamma$ ; y posteriormente creció en un medio con L-arginina pesado. Se detectaron 1500 proteínas, de las 174 fueron aumentadas y 189 disminuyeron.

Los estudios se centraron en la actividad enzimática de la endopeptidasa cuya actividad fue elevada en microglía estimulada. Sus inhibidores daban protección parcial contra la neurotoxicidad de los productos generados por THP-a y células microgliales.

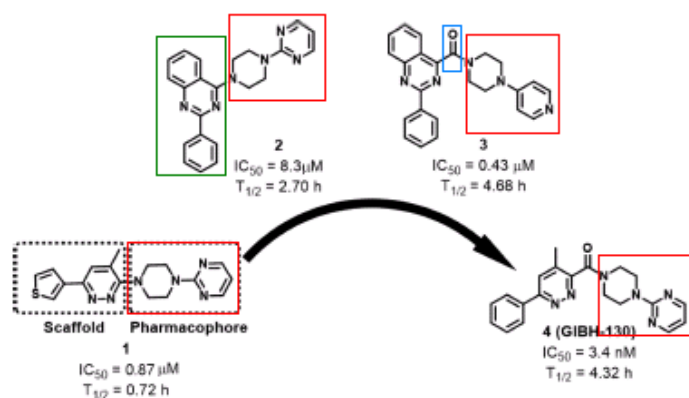


Otro producto que se detectó es el  $H_2S$ , que a pesar de su toxicidad se trata de un componente fisiológico que al parecer reduce la inflamación del efecto producido de los lipopolisacáridos. En laboratorio se demostró que este compuesto se sintetiza en los astrocitos y que los agentes de liberación de  $H_2S$  antagonizan la neurotoxicidad de la microglia <sup>[3]</sup>.

- **Diseño de nuevos fármacos**

Por ello, se ha diseñado nuevos fármacos con acción antiinflamatoria intentando solventar algunos problemas. Se desarrolló la molécula 1(indicada en la imagen) capaz de suprimir la activación de la microglia y se vio una mejora de la memoria en ensayos in vitro en ratones. Se utilizó IL-1 $\beta$  como marcador, debido a ser una molécula muy sintetizada por la microglia activada. A partir de ella se desarrollo nuevas moléculas utilizando la piridazina como grupo farmacóforo intentando mejorar algunas de sus características químicas (figura 9).

Se intentó mejorar la molécula 1, y se introdujo un grupo quinazolina dando lugar a la molécula 2, que no era metabolizado tan rápidamente, por tanto tenía una vida media más larga y su espacio químico era más amplio. Una nueva modificación, la introducción de un grupo carbonilo (molécula 3), permitió una reducción más potente en cuanto a la síntesis IL-1 $\beta$ , pero no llegaba elevada concentración al SNC. Para resolver esto, se partió de la molécula 1 y 3, dando como resultado un nuevo fármaco GIBH-130 (molécula 4) que mejoraba todas las características anteriores y tenía actividad frente la inflamación. Los diseños que se hicieron en la molécula se recogen en la figura 8.



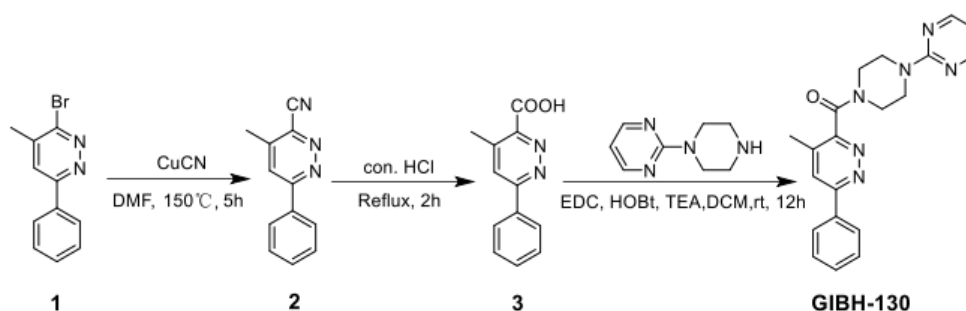
**Figura 8.** GIBH-130 ha sido desarrollado a partir de la estructura 1 y 3. Los diferentes diseños tienen en común el grupo farmacóforo y a partir de ahí, se fue modificando la estructura con el fin de alcanzar una mayor selectividad y efectividad.

GIBH-130 resultó ser muy selectivo y se vio una reducción en la síntesis de IL-1 $\beta$ . Presenta las siguientes características: es biodisponible por vía oral, y su vida media de 4.32 horas, también es capaz de atravesar la BHE, en cuanto a las posibles reacciones adversas se vio que podría haber un bajo riesgo de prolongar el intervalo QT, y la administración consecutiva de GIBH-130 no alteraban el peso corporal ni la flexibilidad del comportamiento.

Se concluyó que la administración oral de GIBH-130 podría mantener la concentración plasmática y cerebral sin causar un efecto tóxico <sup>[8]</sup>.

- **Ejemplo de una síntesis de un inhibidor de la COX:**

En la figura 9 se muestra la síntesis del fármaco GIBH-130. Los diferentes reactivos fueron obtenidos de fuentes comerciales que se utilizaron tal y como se recibieron.



**Figura 9:** Síntesis del GIBH-130.

En primer lugar se preparó 3-bromo-4-metil-6-fenilpiridazina (compuesto 1).

A continuación, 10 g de este compuesto se hicieron reaccionar con 5.39g de cianuro cuprosos (I) suspendido en dimetilformamida y se calentó hasta alcanzar los  $150^\circ\text{C}$ . Tras esto se separó la capa orgánica y se añadió agua fría y éter dietílico. Se adicionó éter dietílico (3x100 ml), y se separó la fase acuosa, haciendo un lavado posteriormente con agua destilada y salmuera. Finalmente se filtró al vacío obteniéndose un polvo marrón que corresponde con el compuesto 2.

Se continuó la reacción suspendiendo 3.9 g de este producto obtenido en 100 ml de HCl concentrado, se calentó a reflujo 2h y tras esto, se mezcló con hielo ajustando pH a 9-10 con NaOH. Después se adicionó acetato de etilo (150 ml x 2) y se separaron

fases. La orgánica se acidificó, apareciendo entonces un precipitado de color blanco que se filtró a vacío y se lavó con éter dietílico. El polvo obtenido se tuvo en un horno de secado durante 24 h a 45 °C. Corresponde con el ácido 3 - metil - 6 - fenilpiridazina - 3 - carboxílico; compuesto 3.

Para finalizar, se añadió trietanolamina a una solución formada por el compuesto 3 y HOBt. Se adicionó diclorometano (100 ml) y se dejó en agitación durante 12 h a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó por vacío y se purificó en cromatografía en columna sobre gel de sílice dando lugar al GIBH-130 <sup>[8]</sup>.

## **CONCLUSIÓN**

En este informe se ha recogido información sobre una nueva diana desde la que se puede abordar la enfermedad del Alzheimer, en concreto actuando sobre la inflamación de la microglía.

Los nuevos estudios realizados han descrito nuevas posibles terapias, aun en desarrollo; pero su investigación puede ser muy productiva para avanzar en la prevención de esta enfermedad. De ellos se extraen ideas importantes como el descubrimiento nuevas sustancias químicas endógenas con poder antiinflamatorio como es el caso del H<sub>2</sub>S, o que el sistema del complemento puede desencadenar inflamación.

El fármaco GIBH-130 ha resultado ser muy selectivo e inhibidor muy efectivo de la inflamación. Aún sigue en investigación y podría ser muy beneficioso para tratar la enfermedad, ya que se ha visto en el estudio realizado que mejora la memoria, aunque puede tener un cierto riesgo cardiovascular. En definitiva la estructura de la molécula puede ser el modelo para el desarrollo de otros fármacos efectivos en patologías del SNC.

En general, la investigación de este campo está en sus inicios y se espera un avance en el tratamiento de la enfermedad del Alzheimer con el fin de mejorar y prevenir la patología, que cada vez hay más población afectada.

## **BIBLIOGRAFIA**

- [1] Cruz López, O; Diseño, síntesis y evaluación biológica de N-fenilindoles como inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2 (Tesis doctoral), 2005, 3-22.
- [2] Daniel Press, MD; Michael Alexander, MD, *Treatment of dementia*, 2017.
- [3] Edith G. McGeer and Patrick L. McGeer; *Journal of Alzheimer's Disease, Neuroinflammation in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Field in Its Infancy.*, 2010,6, 355–361
- [4] Jordán J, Aguirre N, Fernández Gómez FJ y Galindo M<sup>a</sup> F . Énfasis en el fármaco, 2006, 4, 260.
- [5] Martín Moreno, AM<sup>a</sup>, Mecanismos de la acción neuroprotectora de los cannabinoides en la enfermedad de Alzheimer (Tesis doctoral), 2011, 9-21.
- [6] Publicación del consejo General de Colegios oficiales de farmacéuticos (2016) *Enfermedad del alzheimer*, 180, 1-10.
- [7] Nie Q, Du X-G, Geng M-Y. *Acta Pharmacologica, Small molecule inhibitors of amyloid  $\beta$  peptide aggregation as a potencial therapeutic strategy for Alzheimer's disease*, 2011, 546-548.
- [8] Wei Zhou, Guifa Zhong, Sihai Fu, Hui Xie, Tianyan Chi, Luyi Li, Xiurong Rao, Shaogao Zeng, Dengfeng Xu, Hao Wang, Guoqing Sheng, Xing Ji, Xiaorong Liu, Xuefei Ji, Donghai Wu, Libo Zou, Micky Tortorella, Kejian Zhang, and Wenhui Hu, *ACS Chemical Neuroscience Microglia-Based Phenotypic Screening Identifies a Novel Inhibitor of Neuroinflammation Effective in Alzheimer's Disease Models. ACS Chemical Neuroscience*. 2016, A-H.